

## Congenital Malformation Caused by Bisphenol A in Developing Chick Embryo

Su Won Kim<sup>1</sup>, Jin Sik Kim<sup>1</sup>, Hye Myung Ryu<sup>1</sup>, Jin Sik Nam<sup>2</sup>, Hong Sik Cheigh<sup>3</sup>,  
Byung Tae Min<sup>4</sup>, Soo Hyun Park<sup>4</sup> and Min Yoo<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea,

<sup>2</sup>Department of Food & Nutrition, Suwon Women's College, Hwasung, Kyonggi 445-895, Korea,

<sup>3</sup>Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, Busan 609-735, Korea,

<sup>4</sup>Vilac Company LTD. R&D Center, Kimhae, 621-190, Korea

We have examined congenital malformation in developing chick embryo caused by endocrine disruptor, bisphenol A (BPA). We injected BPA into the air sac of developing egg on day 4 of incubation. BPA-treated group with a concentration of 10 µg/egg showed a little decrease on their body length compared to the untreated group. But the group treated with 50 µg/egg revealed severe malformation in eyeballs and bills. The group treated with 100 µg/egg could not continue their development after few days of incubation. These results indicate that BPA clearly inhibits the normal development in chick and it should be toxic to the developing fetus at early stage and in various tissues. The study should contribute to the understanding of toxic effect of BPA in developing human fetus when exposed to the BPA.

**Key Words:** Bisphenol A, Chick embryo, Malformation

### 서 론

최근에 산업이 발달하고 서구화되면서 농약을 비롯한 중금속, 합성수지, 화학물질 등의 생산과 사용이 증대되어 왔다. 이러한 물질들은 인간의 삶을 윤택하게 하는데 필수적인 요소가 되었지만, 반면에 이로 인해 인간과 자연이 피해를 입는 사례 또한 발생하고 있다 (Berghard et al., 1993; Nakata et al., 1993; Colborn et al., 1996). 특히 화학물질 중에서도 인간과 동물에서 정상적인 내분비 기능을 저해하고, 생식, 행동, 신경, 면역계의 기형과 비정상적인 기능을 초래하는 것으로 알려져 있는 내분비계 교란물질 (Endocrine Disruptors; EDs), 일명 환경호르몬은 세계적으로 관심의 대상이 되고 있다 (McLachlan, 1993; Kavlock et al., 1996; Toppari et al., 1996; US EPA, 1997).

내분비계는 생체에서 호르몬을 생산, 방출하는 기관으로 항상성 유지, 자극에 대한 반응, 성장, 발육, 생식 조절, 에너지의 생산, 이용, 저장 등의 기능을 한다 (Eubanks, 1997).

이에 반해 내분비계 교란물질은 생체로 유입되어 내분비계를 교란시켜 정상적인 호르몬 작용에 영향을 주는 합성 또는 자연 화학물질이다. EDs는 호르몬과 유사하게 작용해서 호르몬 수용체에 결합하여 정상 호르몬처럼 작용하거나 호르몬 수용체 결합부위를 봉쇄하여 호르몬이 수용체에 접근하는 것을 막아 해로운 대사작용을 유발하게 하는 작용을 한다. 게다가 EDs는 생체호르몬과 달리 쉽게 분해되지 않고 생물체에 농축되는 성질을 가지고 있다 (Berghard et al., 1993; Nakata et al., 1993). 이로 인해 호르몬 분비의 불균형, 생식 기능 저하, 생식기관 기형, 성장저해, 암 유발, 행동발달 장애, 면역기능 저해 등의 피해가 생기는 것으로 알려져 있다.

이러한 내분비계 교란물질 중 bisphenol A (BPA)는 국내에서 법적으로 규제되고 있지 않은 물질이지만, 미국 환경보건청 (US Environmental Protection Agency, EPA)에서는 유력한 EDs로, 캐나다 세계생태보전기금 (World Wildlife Fund Canada, WWF)에서는 확인된 EDs로 분류되어 관리되고 있다 (WWF, 2000).

BPA는 분자량이 228.29 Da이며, 녹는점과 끓는점이 각각 150~159°C, 224°C (at 4 mmHg)인 화학물질로, 아세틸과 2분자의 페놀 축합에 의해 합성된 것이다. 주로 음료수 캔의 내부 코팅제, 유아용 플라스틱 젖병, 생수통, 방염커튼, 치과 치료제, 컴팩트 디스크, 감열지, 접착제, 페인트 등의 원료로 생활 속에 널리 사용되고 있으며 1998년 미국 환경부

\*논문 접수: 2004년 11월 5일  
수정재접수: 2004년 12월 10일

†Corresponding author: Min Yoo, Department of Biology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea.  
Tel: 053-580-5000, Fax: 053-580-5537  
e-mail: ymin@kmu.ac.kr

조사 결과 연간 61,287톤이 사용되고 있다 (Benjonathan et al., 1998).

BPA의 대한 연구 사례로 흰쥐를 이용하여 난소를 적출한 실험에서 BPA가 여성호르몬 (estrogen) 활성을 가진다고 보고된 적이 있는데 (Dodd et al., 1936) 이때 유방암 세포의 분열 증식을 유도한다는 것이 알려짐으로서 내분비 교란물질임이 확인되었다 (Nagel et al., 1997). 또한 BPA가 흰쥐에서 태줄 또는 모유를 통해 다음 세대로 전달될 가능성이 있다는 보고 (Nagel et al., 1997)도 있고, 자궁에 노출 시 자궁 세포의 증식을 증가시키는 것으로도 알려져 있다 (Steinmetz et al., 1997; Benjonathan et al., 1998). 또한 임신한 흰쥐에 투여하면 다음 세대에서 부정소 크기의 감소, 전립선 무게의 증가를 보여주었다 (vom Saal et al, 1998). 이 외에도 치과 치료제, 식용 통조림, 캔 식품으로부터 BPA가 용출되어 보고된 바 있다 (Brotons et al., 1995; Olea et al., 1996).

따라서 BPA에 노출될 경우 체내에 축적되어 내분비계 장애를 일으키고, 이러한 장애는 발생 중인 태아의 장기 손상과 관련할 것으로 추측할 수 있지만 해부학적 및 정량적 분석이 어려워 아직까지 연구가 미비한 현실이다.

본 연구에서는 BPA가 발생에 미치는 영향을 주로 알아보기 위해 chick embryo를 사용하였다. Chick embryo는 확인과 이용이 편리하고 비용이 적게 들 뿐 아니라 전체적인 발생 기간이 짧다는 점, BPA 주입이 용이하다는 점 등 여러 가지 장점이 있다. 우리는 수정란의 air sac 부근에 작은 구멍을 낸 다음 BPA를 주사기를 사용하여 농도별로 투여하여 부란기에서 6일, 9일, 12일, 18일, 21일째 깨어봄으로써 chick embryo의 발생상태를 육안으로 관찰하였다. 연구의 초점을 체장 (body length)과 각종 기형 조사에 두어 BPA가 chick embryo의 발생에 미치는 기형독성시험을 실시하였다. 본 연구는 조류에 대한 BPA의 발생학적 연구를 통해 발생중인 사람의 태아가 BPA에 노출되었을 때 예상되는 선천성기형을 미리 확인하고 예방하기 위한 기준과 대책을 마련하는데 기여할 것이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

White Reghorn 품종의 수정란을 경상남북도 농가와 양계장 등에서 구입하였으며 평균 발생율은 90% 이상으로 확인되었다. 수정란의 무게는 대체로 52~63 g이었다.

### 2. 재 료

Bisphenol A 등 본 실험에서 사용한 모든 시약들은 Sigma Co. (USA) 제품이었다. Epp. tube, tip, petri dish, 1 ml disposable syringe 등은 모두 일회용품을 사용하였다. 실험에 사용된 초

자기구는 121℃에서 15분간 고압증기멸균한 뒤 사용하였다.

### 3. 부란기 조건

온도와 상대습도를 조절할 수 있고, 공기순환과 난좌를 회전시키는 교반시설이 있는 부란기 (은조상사, Korea)를 사용하였다. 배양조건은 온도 37~38℃, 상대습도 50~60%를 유지하였다.

### 4. 시험물질

BPA를 30% EtOH에 녹여 멸균 후 빛이 닿지 않는 서늘한 곳에서 보관하였다. BPA 용액은 실험하기 전에 농도별로 희석하여 사용하였다.

### 5. 시험군 설정

무처치 대조군과 용매 대조군으로 15% EtOH 투여군을 두었으며, 이는 BPA를 희석했을 때의 EtOH 농도가 된다. 실험군으로는 1 µg/egg BPA 투여군, 20 µg/egg BPA 투여군, 40 µg/egg BPA 투여군, 50 µg/egg BPA 투여군, 60 µg/egg BPA 투여군, 80 µg/egg BPA 투여군, 100 µg/egg BPA 투여군, 200 µg/egg BPA 투여군, 300 µg/egg BPA 투여군, 400 µg/egg BPA 투여군, 500 µg/egg BPA 투여군을 두었다.

### 6. 시험물질 투여

수정란의 air sac 부근에 미리 작은 구멍을 만든 다음 발생시켰다. 발생 중인 무처치 대조군을 0~4일까지 매일 같은 시간에 깨어 발생 정도를 확인하였고, 혈관 형성이 왕성하게 일어나는 3~4일에 농도별로 용액을 투여하였다. 모든 대조군과 실험군의 투여량은 100 µl/egg로 하였다. BPA 투여군의 경우 30% EtOH에 BPA를 10 µg/ml 되게 녹인 후 EtOH의 최종 농도가 15%가 되게 농도별로 희석하여 사용하였다. 용액의 투여방법은 air sac 부근에 미리 만들어 놓은 구멍을 통해 1 ml disposable syringe를 이용해 조심스럽게 투여하였다.

### 7. 검사와 통계적 처리

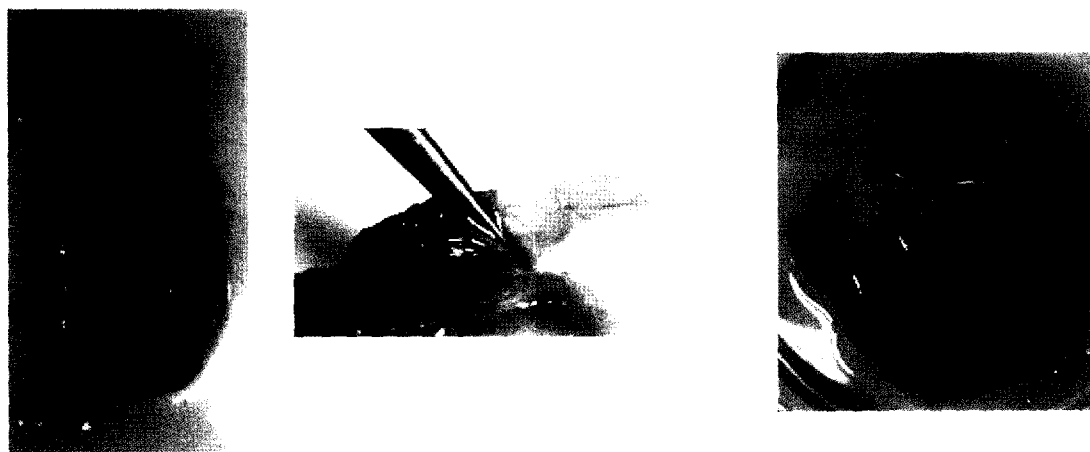
발생유무의 검사는 6일, 9일, 12일, 15일, 18일, 21일째 매일 같은 시간에 시행하였다. Petri dish에 수정란을 깨어 chick embryo를 육안으로 검사하였으며, 발생의 유무와 기형 등을 조사하고, 디지털 카메라로 촬영하였다.

## 결 과

혈관의 형성은 발생 3일에 시작한 것을 확인할 수 있었고, 발생 4일에 왕성하게 형성되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이에 발생 4일에 BPA를 투여하였고, BPA를 투여한 후 발생 6일, 9일, 12일, 15일, 18일, 21일에 petri dish에 조심스럽게 깨

**Table 1.** Experimental data on the body length (cm)

|            | 6일    | 9일    | 12일   | 15일   | 18일   | 21일   |
|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Control    | 2     | 3     | 4     | 6     | 8     | 9.5   |
| 15% EtOH   | 2     | 3     | 4     | 6     | 7.5   | 8.5   |
| 1 µg/egg   | 2     | 3     | 4     | 6     | 7.5   | 7.5   |
| 20 µg/egg  | 2     | 2.8   | 4     | 6     | 7.5   | 8     |
| 40 µg/egg  | 1.8   | 2.8   | 3.5   | 5.5   | 7     | 8.5   |
| 50 µg/egg  | 1.4   | 2.7   | 3.5   | 5.5   | 6.5   | 7     |
| 60 µg/egg  | 1     | 2.5   | 3.5   | 5     | 6     | 8     |
| 80 µg/egg  | Cease | Cease | Cease | Cease | Cease | Cease |
| 100 µg/egg | Cease | Cease | Cease | 5.5   | 4.5   | Cease |
| 200 µg/egg | Cease | Cease | 3.5   | Cease | Cease | Cease |
| 300 µg/egg | Cease | Cease | Cease | Cease | Cease | 8.5   |
| 400 µg/egg | Cease | 3     | Cease | Cease | Cease | Cease |
| 500 µg/egg | 1     | Cease | Cease | Cease | Cease | Cease |



**Fig. 1.** Malformation of legs induced by BPA (18th days)



**Fig. 2.** Malformation of eyeballs and bills induced by BPA (21st days)

어 육안으로 체장과 형태적 기형을 조사하였다. 무처리 대조군과 비교해 용매 대조군인 15% EtOH 투여군과 실험군인 BPA 1 µg/egg, 20 µg/egg 투여군의 경우는 거의 같은 모습과 체장을 보였지만 발생 후반부에서 유의성 있는 체장의 감소가 보였다. 이에 반해 BPA 40 µg/egg, 50 µg/egg, 60 µg/egg 투여군에서는 모든 날에서 체장의 유의적인 감소를 보였다 (Table 1). BPA 80 µg/egg, 100 µg/egg, 200 µg/egg, 300 µg/egg, 400 µg/egg, 500 µg/egg 투여군에서 간헐적으로 발생 중인 개체가 나오기도 하였지만 많은 부분에 있어서 BPA 투여 시점을 기준으로 발생이 정지됨을 볼 수 있었다. 또한 4개체에서 기형이 발생하였는데 안구, 부리, 다리 기형과 후두부 부종이 나타났으며, 특히 안구와 부리에 대한 기형은 동시에 나타남을 볼 수 있었다 (Fig. 1, 2).

## 고 찰

BPA는 EDs의 일종으로 여성호르몬 (estrogen) 활성을 가지고 있으며, 인간과 동물에 있어서 생식기능의 이상과 성기 기형을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이러한 BPA는 우리 생활에서 식품용기 포장재, 코팅, 치료, 접착 등의 재료로 널리 사용이 되고 있어 비교적 노출가능성이 많은 EDs라 할 수 있다. BPA 또한 다른 EDs처럼 생체 내에 축적되어 다음 세대에게까지 영향을 미칠 수 있기 때문에 문제가 매우 심각하다는 판단이다. 일본에서는 이미 BPA를 대체한 식품용기가 개발되었으나 우리나라에서는 아직 이에 대한 연구도 미흡하고 또한 대책 마련도 없어 그 심각성을 더하고 있다.

이에 본 연구에서는 특히 BPA가 발생에 미치는 영향을 평가하기 위해 chick embryo를 이용하여 그 독성 정도와 처리 결과를 조사하였다. BPA의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 체장이 감소하는 것을 볼 수 있었고, 4개 개체에 있어서는 안구, 부리, 다리, 후두부 부종과 같은 기형도 발생하였다. 특히 안구 기형과 부리 기형이 동시에 나타난 것으로 보아 BPA의 독성효과가 여러 조직에 다발적으로 미칠 수 있고, 또한 대단히 파괴적이라는 점이 주의할 요소라 사료되었다.

80 µg/egg 이상의 투여군에서도 비록 수는 적지만 간헐적으로 정상 발생하는 개체가 관찰되었다. 이는 효과가 개체마다 다르고, 독성이 나타나는 결과도 개체마다 다양하다는 환경호르몬의 일반적인 특성을 증명해 주는 것으로 사료되었다. 즉 환경호르몬에 대한 연구가 그 동안 미진할 수밖에 없었던 이유 중 하나가 정량 분석이 어렵다는 것이었는데 일정한 농도에서도 개체마다의 반응 패턴이 워낙 다양하여 독성 영향을 한마디로 평가할 수 없었기 때문이다.

본 연구의 서론에서 언급했듯이 chick embryo 발생 실험에 의해 BPA의 생체 노출 기준이 마련되기를 기대하였다.

그러나 약 1,000여 개 이상의 수정란을 실험에 사용하였지만 chick embryo 발생 실험의 특성상 변수가 너무 많이 작용함으로써 일관된 기준을 마련하기에 부족함이 있다고 사료된다. 그럼에도 불구하고 BPA의 독성효과를 확실히 규명하였고 여러 가지 선천성기형 또한 관찰함으로써 발생 중인 태아가 BPA에 노출되면 치명적일 수 있다는 결론을 얻어내었다.

따라서 본 연구의 결과를 기초로 더욱 체계적인 실험계획을 확립하여 명확한 기준을 마련하고, 안구 및 기타 조직발생의 상관관계 또한 분자적 차원에서 규명하는 후속연구가 진행되어야 할 것이다. 환경호르몬의 중요성을 인식하면서도 아직 그에 대한 연구가 매우 미비한 실정이므로 본 연구의 결과가 BPA를 비롯한 EDs에 대한 발생, 독성 기전 연구에 있어 기초 자료로 활용될 수 있고, 각종 의약품이나 건강식품에 대한 연구와 개발에 기여할 것으로 기대한다.

## 감사의 글

본 연구는 과학기술부·한국과학재단 지정 계명대학교 전통미생물자원 개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것임.

## REFERENCES

- Benjonathan N, Steinmetz R, Xenoestrogens. The emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinol Metab.* 1998. 9: 124-128.
- Berghard A, Gradin K, Pongratz I, Whitelaw M, Poellinger L. Cross-coupling of signal transduction pathways: The dioxin receptor mediates induction of cytochrome p450IA1 expression via a protein kinase C mechanism. *Mol Biol.* 1993. 13: 677-689.
- Brotons JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N. Xenoestrogens released from lacquer coating in foodcans. *Environ Health Persp.* 1995. 103: 608-612.
- Colborn T, Dumanoski D, Myers JP. Our stolen future: are we threatening our fertility, intelligence, and survival? A scientific detective story. New York. Penguin Group. 1996.
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM. Development effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Persp.* 1993. 101: 378-384.
- Colborn T, Somlen MJ. Epidermiological analysis of persistent organochlorine contaminants in Cetaceans. *Rew Environ Toxicol.* 1996. 146: 91-172.
- Dodd EC, Lawson W. Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature.* 1936. 137: 996.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C, Miller R, Moore J, Rolland R, Scott G, Sheehan DM, Sinks T, Tilson

- HA. Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Persp.* 1996. 104: 715-740.
- McLachlan JA. *Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics.* *Environ Health Persp.* 1993. 101: 386-387.
- Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Persp.* 1997. 105: 70-76.
- Nakata N, Kato H, Kogure K. Protective effects of basic fibroblast growth factor against hippocampal neuronal damage following cerebral ischemia in the gerbil. *Brain Res.* 1993. 605: 354-356.
- Olea N, Pulgar R, Perez P, Olea-Serrano F, Rivas A, Novillo-Fertrell S, Pedraza V, Soto AM, Sonnenshein C. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Persp.* 1996. 104: 298-305.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ, Jr, Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N, Leffers H, McLachlan JA, Meyer O, Muller J, Rajpert-De Myts E, Scheike T, Sharpe R, Sumpter J, Skakkebaek NE. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Persp.* 1996. 104: 741-803.
- US EPA. Special report on environmental endocrine disruption: An effect assessment and analysis. EPA. 630/R-96/012. Washington DC 20460. 1997.
- vom Saal FS, Cooks PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, Parmigiani S, Welshons WV. A physiologically based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health.* 1998. 14: 239-260.
- World Wildlife Fund European Toxics Programme Report. Bisphenol A, A known endocrine disruptor. 2000.